

Title	Electrofusion of Mesenchymal Stem Cells and Islet Cells for Diabetes Therapy: A Rat Model( Abstract_要旨 )
Author(s)	Yanai, Goichi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-05-25
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/200315">http://hdl.handle.net/2433/200315</a>
Right	許諾条件により本文公開日確認中
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

京都大学	博士（医学）	氏 名	柳 井 伍 一
論文題目	Electrofusion of Mesenchymal Stem Cells and Islet Cells for Diabetes Therapy: A Rat Model (糖尿病治療のための間葉系幹細胞と膵島細胞の電氣的融合：ラットモデル)		
(論文内容の要旨)			
【研究背景及び目的】			
世界的に患者数増加が著しい糖尿病において膵島移植は一定の効果を治めてはいるもののドナー不足が深刻であり新しいドナーソースの開発が急務である。			
分化能や増殖能に優れ、炎症・免疫制御、血管新生誘導、抗アポトーシスなどの機能を有するとの報告がある間葉系幹細胞（以下 MSC）は、膵島との共培養で膵島の機能が改善することや、共移植により移植成績が向上することがわかってきている。			
細胞融合は生体内でも起こりうる現象として知られている。一方 ES 細胞と体細胞を人工的に融合させることで核のリプログラミングが起こり細胞の分化転換が引き起こされるという報告もある。そこで MSC と膵島細胞の融合細胞を作成し糖尿病治療における有用性を検討した。			
【研究手法及び結果】			
Lewis ラットあるいは C57/BL6 マウス大腿骨から採取した骨髄を 12.5%FBS 添加 DMEM/F12 培地中にて培養し、継代を繰り返すことで MSC を得た。また Lewis ラット膵臓から単離した膵島を 0.5%トリプシン-EDTA を用いて単一細胞に分散した。これらを混合し、電氣的に融合させ（ELECTRO CELL MANIPULATOR 2001：ネッパジーン社）、融合細胞の作成に成功した。この融合細胞は培養後 20 日後でもグルコース応答性インスリン分泌能が観察できたが分散膵島細胞と MSC の共培養では観察できなかった。			
ストレプトゾトシン尾静脈注射(55mg/kg)によって糖尿病とした Lewis ラット（飽食時血糖値：500mg/dL 以上）の腎被膜下への移植実験を行い、血糖値と体重を 91 日後まで経時的に測定した。膵島 2000 個移植では血糖値、体重ともに著明な改善が見られた(移植 91 日後血糖値：140.0±5.5mg/dL、体重：429.0±15.6g：数値は平均±SEM、以下同様)のに対し、膵島 1000 個単独（移植 91 日後血糖値：407.33±40、体重：300.5±7.94）及び 1000 個と MSC の共移植（移植 91 日後血糖値：415.33±9.29、体重：325.11）では改善効果が見られなかった。一方膵島 1000 個を用いた融合細胞では次第に血糖値が低下し正常値に近付いていった。（移植 91 日日後血糖値：248.6±20.4mg/dL、体重：348.1±20.3g）。融合細胞における核のリプログラミングを確認するため、ラット膵島細胞とマウス MSC の融合細胞を作成した。対照として非融合細胞（膵島細胞と MSC の共培養）を用いた。融合細胞ではラットの MSC 特異的遺伝子（sca-1、CD106）及びマウスの膵島特異的遺伝子（inslin-1、pdx1、ngn3）が発現しており相互の核がリプログラミングされていることが判明した。一方、非融合細胞ではこのような発現は見られなかった。また、同様の細胞を用いて細胞のアポトーシスおよび増			

殖能について検討した。アポトーシス関連遺伝子として知られる **Caspase-3** の発現は非融合細胞に比べ融合細胞でその発現が低下した。更にアネキシン染色においても非融合細胞と比し染色性が低下し、融合細胞におけるアポトーシスの軽減が示唆された。また、細胞増殖マーカーとして知られる **Ki-67** の発現について検討を行ったところ、融合 1 日目では確認できなかったが、5 日目に融合細胞においてのみその発現が確認された。

【結語】

電氣的細胞融合によりに得られた本研究の融合細胞は、膵島機能を維持しつつ間葉系幹細胞の増殖能や抗アポトーシス機能を有する強靱な細胞であり、新たな細胞資源として糖尿病治療への有用性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

重症化した糖尿病における膵島移植はドナー不足等の問題が深刻であり新しい細胞資源の開発が急務である。また分離膵島はアポトーシス等により機能が減衰し、一方生体外での増殖も難しく分離膵島の脆弱性も問題である。そこで申請者らは膵島との共移植により移植成績が向上することが報告された間葉系幹細胞（以下 **MSC**）に着目した。**MSC** は増殖能に優れ、免疫制御、抗アポトーシス作用などを有している。一方幹細胞と体細胞との融合にて核のリプログラミングなどにより細胞の分化転換が起こることも分かっている。そこで **MSC** と膵島細胞の融合細胞を作成し糖尿病治療における有効性を検討した。

電気融合にて作成された融合細胞は分離膵島に比べ長期間にわたりグルコース応答性インスリン分泌能を維持し、また糖尿病性ラットへの移植では糖尿病状態が改善しないとされる膵島数でも改善傾向が観察された。また由来となった両細胞の核にリプログラミングが起きていることが示唆された。更に膵島由来細胞核に **Ki-67** が新たに発現し、膵島細胞の性質を有した細胞の増殖が示唆された。更にカスパーゼ 3 の発現抑制やアネキシン染色性の低減など、アポトーシス抑制が示唆された。

よって、この論文では **MSC** と膵島細胞とを用いての電気融合により両細胞の性質を兼ね合わせた細胞を作製することに成功しており、より少量での移植効果が期待出来る融合細胞は糖尿病治療におけるひとつの可能性を示唆している。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 27 年 3 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。